

(Címlap)

**Az *FMRI* gén premutáció és full mutációs állapotának  
molekulárisgenetikai vizsgálata**

**A doktori értekezés tézisei**

**Biacsi Rea Erika**  
szerző

**Dr. Karen Usdin, PhD**

Témavezető

Szekcióvezető

*Section on Genomic Structure and Function*

*Laboratory of Molekular and Cellular Biology*

*National Institute of Digestive, Diabetes and Kidney Diseases*

*National Institutes of Health*

**Prof. Dr. Orosz László**

Programvezető

*Klasszikus és Molekuláris Genetika Program*

**Prof. Dr. Erdei Anna**

Doktori Iskola Vezetője

*Biológia Doktori Iskola*

*Természettudományi Kar*

*Eötvös Lóránd Tudományegyetem*

**2008**

## 1. Irodalmi bevezetés

A Fragilis X szindróma (FXS) a leggyakoribb öröklődő X-hez kötött mentális retardáció, előfordulási gyakorisága 1:4000 fiúgyermek és 1:8000 lánygyermek között. A szimptomákat a Fragilis X Mentális Retardáció 1 (*FMRI*) gén 5' nem-transzlálódó régiójában elhelyezkedő CGG\*CCG tripletepeat 200 fölé emelkedése miatt az *FMRI* gén elcsendesülése és így az FMRP hiánya okozza.

A full mutációs tartományba történő repeatexpanszió eredményeként létrejövő géncsendesülés folyamata nem ismert, de ebben a stádiumban a gén metiláltá válik, és elcsendesül. A metiláció mind direkt, mind indirekten módon kifejti hatását, mivel direkten gátolja a metilációérzékeny transzkripció faktorok kötődését és indirekten, a kromatin kondenzációját indukálva akadályozza a transzkripció megindulásához szükséges iniciációs komplex kötődését. A repetexpanszió ezenkívül epigenetikai változásokat is beindít a gén 5' régiója környékén normál esetben a lizin csoportjaikon acetilált H3 és H4 hisztonok helyezkednek el, a gén aktív, eukromatin állapotban van. Az FXS sejtekben ugyanezen régió környékén kevésbé acetilált hisztonokat találtak, ami a gén inaktív, heterokromatinizált állapotát jelzi. A hisztonok metiláltsága szintén érintett, míg a normál esetben a 3-as hiszton 4-es lizincsoportjának metiláltságát és a 4-es hiszton 9-es pozíciójú lizinjének metilálatlanságát írták le, addig az FXS sejtekben ennek ellenkezőjét tapasztalták és a 4-es hiszton 9-es lizincsoportjának metiláltsága volt megfigyelhető, ami a heterokromatin állapotra jellemző.

Más, alaposabban kutatott gének esetére alapozva azt várhatjuk, hogy több hiszton végződés is eltérő módon acetilált illetve metilált a normál és az aberráns módon elcsendesült gén esetén. Mivel a gén promóter régiója és az open reading frame változatlan a normál és az elcsendesült gén esetén a gén reaktivációja egy lehetőséget kínál az FXS szimptomák enyhítésére.

Előző tanulmányokban már megpróbálták a csendesülési folyamatot visszafordítani hiszton deacetiláz inhibitorokkal és DNS transzmetiláz inhibitorokkal. A hiszton deacetiláz inhibitorok toxikusaknak bizonyultak és nem

voltak képesek a gént reaktiválni. Egy DNS transzmetiláz inhibitor, 5azadC képes volt ugyan reaktiválni a gént, de hatásosságához sejtosztódások sorozata szükséges, ami nem teszi lehetővé posztmitotikus sejtek, mint a neuronok kezelését, valamint szintén erős toxikus hatással bírt sejt kultúrában.

Az 55 és 200 közötti ismétlődésszámmal bíróknál, akiket a Fragilis X premutációs allélt hordozóknak hívnak, a Fragilis X-hez társuló tremor ataxia szindróma (FXTAS) társul ehhez az állapothoz. A női hordozóknál továbbá petefészek rendellenesség és korai menopauza fordul elő megemelkedett valószínűséggel, míg a premutációt hordozó nők gyermekei esetén magas a kockázat arra, hogy 200 feletti, úgynevezett full mutációs allélt örökölnek repeatexpanszió eredményeként. A premutációt hordozóknál a repeatszám növekedésével az *FMR1* gén mRNS szintje növekszik 2-10-szeresére, míg az FMRP szint csökken, a 190 repeatszámuakban már csak a normál szint 40%-a található. A szimptomákban van átfedés a premutációs és a full mutációt hordozók között, talán a repeatszám negatív hatása a translációra ami feltűnő a premutációs tartományban és eredménye a szignifikáns FMRP szint csökkenésben. A hosszú CGG repeatok ezenkívül toxikus hatásúak.

Az FXS szindróma tanulmányozására már rendelkezésre áll egy KO egérmodel, amely amelyikben az FMRP hiánya és az FXS betegekhez hasonlóan az ehhez kapcsolódó tünetek megfigyelhetők és tanulmányozhatóak, azonban ebben az egérmodelben a full mutációs allél hatása, az általa előidézett epigenetikai, DNS metilációs és egyéb változások nem tanulmányozhatóak.

A premutációs allélokhoz társuló egyre növekvő számú betegség felvetette az igényt ezen betegségek és a repeatexpanszió egérmodelben való tanulmányozására. Egy premutációs méretű *Fmr1* allélt tartalmazó, első ilyen egérmodel sajnos az *Fmr1* mRNS szint emelkedést tudta modellezni, de a premutációs betegknél megfigyelt, ezzel együttjáró FMRP szint csökkenést nem mutatta, így a csökkent FMRP szint okozta tünetek tanulmányozására nem bizonyult alkalmasnak. Továbbá ez az egérmodel nem mutatta a premutációt hordozókban fellépő nagy repeatszám ugrásokat sem a transzmissziók során. Így továbbra is fennáll az igény egy ilyen modelállat létrehozására.

## **2. Munka célkitűzései**

1. Az eddig próbált hiszton deacetiláz és DNS transzmetiláz inhibitorokkal szemben, amelyek vagy csak kis hatást fejtettek ki a Fragilis X szindrómában szenvedő betegekben elcsendesült FMR1 gén reaktivációjára, vagy nagyon toxikusnak bizonyultak, hatékonyabb és kevésbé toxikus kémiai komponenseket kerestünk, amelyek képesek az elcsendesült gént reaktiválni.
2. Az eddig nem tanulmányozott, III. osztályba tartozó hisztondeacetilázok szerepének tisztázását tűztük ki célul az FMR1 gén elcsendesülési folyamatában.
3. Az FMR1 gén reaktivációjának és elcsendesülésének mechanizmusában szerepet játszó epigenetikai változásokat kerestük, e folyamatok megértése és a jövőbeni célzott farmakológiai stratégia elősegítése céljából.
4. A laborunkban előállított Fmr1 knock in egérmodelben, amely premutációs tartományba tartozó repeatszámot tartalmaz, a humán premutációt hordozó egyénekben leírt anatómiai elváltozásokat kerestünk, a modelállat modelként való használatának igazolására.
5. Tanulmányunk célja volt továbbá, hogy az Fmr1 knock in egérmodel premutációs alléljának repeatszám változását nyomonkövessük generációról generációra, és ezzel a premutációs allélok full mutációs alléllá való növekedését tanulmányozhassuk, amire eddig nem volt mód az ezt megelőzően előállított egérmodellek esetén.

### 3. Alkalmazott módszerek

1. Az *FMRI* gén elcsendesülésének mechanizmusát FXS betegekben származó limfoblaszt és fibroblaszt sejtek hiszton deacetiláz és DNS transzmetiláz inhibitorokkal való kezelésével monitoroztuk.
2. A kezelések hatására létrejövő *FMRI* génexpressziós változásait kvantitatív real-time PCR technikával, az bekövetkező FMRP-szint változásokat western blot technikával, az allélok metilációs státuszát biszulfít konvertált DNS-en végzett real-time PCR-t követően a termékek olvadási görbéje alapján határoztuk meg.
3. A kezelések hatására fellépő epigenetikai változásokat kromatin immunoprecipitációs esszével (ChIP) követtük nyomon.
4. Az elcsendesülési folyamatban a SIRT1 szerepét normál és FXS fibroblaszt sejtek vad típusú SIRT1 és domináns negatív SIRT1 expressziós vektorokkal való transzfekciójával tanulmányoztuk. A transzfekció hatására fellépő expressziószint változásokat kvantitatív real-time PCR-rel detektáltuk. A SIRT1 kötődését a vad és a full mutációs allélhoz ChIP technikával vizsgáltuk.
5. Az hMOF szerepét az FMR1 gén reaktivációjában fibroblaszt sejtekben, domináns negatív hMOF expressziós vektorral vizsgáltuk. A transzfekciót követően végzett kezelések hatására bekövetkező *FMRI* expressziószint változásokat kvantitatív real-time PCR-rel detektáltuk.
6. A KI egér genotipizálását PCR technikával végeztük.
7. Az egérmodelben a transzmissziók során létrejövő repeatszám hosszakat és a bekövetkezett változásokat radioaktívan jelölt PCR-t követően nagy felbontású szekvenáló gélen detektáltuk.
8. A növekvő allélhosszakkal együttjáró *FMRI* gén expressziós változásait kvantitatív real-time PCR-rel követtük nyomon, az allélok metilációs státuszát metiláció érzékeny restrikciós endonukleázos emésztést követően PCR-rel vizsgáltuk, míg az FMRP szintet western blot technikával.
9. A KI egérben jelenlevő patológiai elváltozásokat immunhisztokémiai festésekkel detektáltuk.

#### 4. Tézisek

1. Slitomicin, egy hiszton deacetiláz inhibitor képes volt reaktiválni az elcsendesült FMR1 gént és szignifikáns mRNS-szintet indukált a DNS metilációs státuszának megváltoztatása nélkül.
2. Azt találtuk, hogy a SIRT1 hiszton-deacetiláz fontos az FMR1 gén elcsendesülésében és a SIRT1 kötődés erőteljes bedúsulást mutat a full mutációs allélon.
3. Az hMOF hiszton acetiláz amely szükséges és felelős a H4K16 acetilációjáért, fontos szerepet játszik az *FMR1* gén reaktivációjában, blokkolása domináns negatív hMOF expresszáltatásával a gén reaktivációja nem következett be.
4. A H4K16 deacetilációja az elcsendesülési folyamatban a DNS metilálódásának késői következménye.
5. A laborunkban előállított KI egérmodelben a humán premutációt hordozókhoz hasonlóan a repeatszám növekedésével együttjáró *FMR1* mRNS szint növekedés és FMRP szint csökkenés megfigyelhető volt.
6. A FXTAS-ra jellemző neuropatológiai elváltozások jelenlétét az immunhisztokémiai vizsgálatok igazolták.
7. Ez az első egérmodel ahol az egy generáció alatt a full mutációs tartományba való ugrás figyelhető meg, így ennek tanulmányozására módot teremt.
8. A full mutációs tartományba eső allélok nem mutattak szignifikáns metilációt, a humán esettől eltérően, valamint az alléltvitelnél nem figyelhető meg a full mutációs férfiakban tapasztalható repeatszám csökkenés a hímvarsejtekből.

## 5. Következtetések

1. Az eddig kipróbált hiszton deacetiláz inhibitorokkal szemben, amelyek nem voltak képesek szignifikáns mértékben reaktiválni az elcsendesült FMR1 gént az általunk tesztelt splitomicin képes volt szignifikáns mértékben reaktiválni az elcsendesült FMR1 gént a DNS metiláció megváltoztatása nélkül. Ez egy új lehetőséget vethet fel a posztmitotikus sejtek, mint neuronok esetleges kezelésére.

2. Tanulmányunkban azt találtuk, hogy a III. osztályba tartozó hisztondeacetilázok közül a SIRT1 fontos szerepet játszik az FMR1 gén elcsendesülési folyamatában, míg a reaktivációban a hMOF hiszton acetiláz bizonyult kulcsfontosságúnak.

3. Az FMR1 gén reaktivációja során az H4K16 acetilálódik, míg a DNS metilációs státusza változatlan marad. Így az FMR1 gén elcsendesülése során az H4K16 deacetilációja a DNS metiláció egy késői következménye. Ez a felismerés segíthet a jövőbeni farmakológiai stratégiák kidolgozásában.

4. A laborunkban előállított Fmr1 knock in egérmodelben a humán premutációt hordozókra jellemző patológiai elváltozások, mint a premutációs tartományban megfigyelhető repeatszám növekedéssel járó FMR1 mRNS-szint emelkedés és FMRP-szint csökkenés, az inklúziók jelenléte, a Purkinje sejt deformitások stb. megfigyelhetők voltak, ezek tanulmányozására módot ad.

5. Továbbá ez az első egérmodel amelyben megfigyelhető az egy generáció alatt a premutációs tartományból a full mutációs tartományba való repeatszámaxpanzió, így ennek mechanizmusának vizsgálatára, nyomonkövetésére lehetőséget teremt, amire eddig nem volt mód az ezt megelőzően előállított egérmodellek esetén.

## 6. Publikációs lista

### Referált tudományos folyóiratban megjelent dolgozatok:

**Biacsi, R.**, Daman Kumari and Karen Usdin  
*SIRT1 inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome.*  
PLoS Genet 2008 Mar; 4(3): e1000017(IF: 8.721)

Entezam, A., **Biacsi, R.**, Bonnie Orrison, Tapas Saha, Gloria E. Hoffman, Ed Grabczyk, Robert L. Nussbaum and Karen Usdin. *Regional FMRP deficits and large repeat expansions into the full mutation range in a new Fragile X premutation mouse model.*  
Gene. 2007 Jun 15;395(1-2):125-34.(IF: 2.871)

### Konferencia kiadványok:

**Biacsi R.**, Daman Kumari, Karen Usdin. *Can Histone Deacetylase and DNA Methylase Inhibitors be useful in the treatment of Fragile X Syndrome?* NIH Research Festival, October 17-20, 2006, Bethesda, MD, USA

**Biacsi R.**, Daman Kumari, Karen Usdin. *Histone Deacetylase and DNA Methylase Inhibitors in the Treatment of Fragile X Syndrome?* Experimental Biology 2007, April 28-May 2, 2007, Washington DC, USA

#### **Biacsi R.**

Reactivation of the FMR1 gene in Fragile X cells.  
13<sup>th</sup> International Workshop on Fragile X and X-linked Mental Retardation, October 3-6, 2007, Venezia Lido, Italy

### Nemzetközi konferencián tartott előadások:

#### **Biacsi R. (előadás)**

Reactivation of the FMR1 gene in Fragile X cells.  
13<sup>th</sup> International Workshop on Fragile X and X-linked Mental Retardation, October 3-6, 2007, Venezia Lido, Italy

#### **Biacsi R. (előadás)**

*SIRT1 inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome.*  
Graduate Partnerships Program, Retreat 2008  
July 17-18. Flintstone, MD, USA



**Tudományos intézetben tartott előadás:**

**Biacs R. (előadás)**

*Silencing mechanism and reactivation of FMR1 gene*

Epigenetics Interests Group

April 14, 2008, NIH, Bethesda, MD, USA